家蚕化学感受蛋白 CSP16 的表达及结合特性分析

郭兴国, 陈　莹, 邢秋婷, 邢万静, 阚云超, 乔惠丽*

(南阳师范学院, 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 昆虫生物反应器河南省工程实验室, 中英南阳洛桑昆虫生物学联合实验室, 河南南阳 473061)

摘要:【目的】化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)在昆虫化学信号的感受识别和生长发育调节等生理过程具有重要作用。本研究旨在探索 CSP16 在家蚕 *Bombyx mori* 中的功能。【方法】利用 RT-qPCR 分析 *csp*16 在家蚕不同发育时期和不同组织的表达特征,用原核表达系统对家蚕 CSP16 进行表达纯化,并通过荧光结合实验检测该蛋白与不同配体化合物的结合特性。【结果】RT-qPCR 结果表明,*csp*16 在家蚕 1 -5 龄幼虫中呈规律性表达,各龄期眠蚕中表达量最高,5 龄第 3 天幼虫中主要表达于头、表皮、精巢和卵巢等。蜕皮激素(20E)处理后 *csp*16 在不同龄期幼虫和 5 龄幼虫不同组织中的表达量上调。纯化后 CSP16 的荧光结合实验表明,CSP16 与醇类、酯类、醛类、酚类和苯环类等化合物的亲和力都较弱。【结论】*csp*16 在家蚕不同龄期幼虫眠蚕中表达量最高,蜕皮激素使 *csp*16 在家蚕取食幼虫中的表达量出现上调,提示其可能参与家蚕幼虫的蜕皮过程。

关键词: 家蚕; 化学感受蛋白; RT-qPCR 分析; 蜕皮激素; 结合特征

中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2016)06-0613-09

Expression and binding characterization of chemosensory protein CSP16 in the silkworm, *Bombyx mori*

GUO Xing-Guo, CHEN Ying, XING Qiu-Ting, XING Wan-Jing, KAN Yun-Chao, QIAO Hui-Li*

(Henan Provincial Key Laboratory of Insect Biology in Funiu Mountain, Henan Provincial Engineering Laboratory of Insects Bio-reactor, China-UK-NYNU-RRes Joint Laboratory of Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract:【Aim】Chemosensory proteins (CSPs) play important roles in reception and recognition of chemical signal, and regulation of insect development. This study aims to explore the function of CSP16 in the silkworm, *Bombyx mori*.【Methods】Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to investigate the expression patterns of *csp*16 gene in different developmental stages and different tissues of the 5th instar larvae of *B. mori*. Prokaryotic expression system was used to express and purify CSP16. The binding properties of CSP16 were analyzed by fluorescence binding assay.【Results】The RT-qPCR results showed that *csp*16 was regularly expressed in the 1st -5th instar larvae, and highly expressed in molting larvae of each instar. In day-3 5th instar larvae, *csp*16 was mainly expressed in head, epidermis, testis and ovary. The expression level of *csp*16 was up-regulated in larvae of different instars and different tissues of the 5th instar larvae after treatment with 20-hydroxyecdysone. Purified CSP16 showed weak affinity to different compounds including alcohols, esters, aldehydes, phenols and benzene.【Conclusion】*Csp*16 is highly expressed in molting larvae of each instar of *B. mori*, and the expression level is up-regulated by 20-hydroxyecdysone in larvae during feeding, suggesting that CSP16 may be involved in molting process of silkworm larvae.

Key words: *Bombyx mori*; chemosensory protein; RT-qPCR analysis; 20-hydroxyecdysone; binding property

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201754); 河南省昆虫生物反应器创新团队支持计划(C20140047)

作者简介: 郭兴国, 男, 1989 年 3 月生, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: 916560935@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qiaohuili@nynu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-02-27; 接受日期 Accepted: 2016-05-26

昆虫具有复杂的化学信息感受机制，在其觅食、求偶、产卵、交配、寻找寄主等行为中发挥重要作用。研究者通过对昆虫嗅觉功能的研究，阐明昆虫的嗅觉感受的分子机制，从而控制昆虫对环境化学因子的识别，以期达到害虫防治的目的。昆虫感觉器官上分布着不同类型的感器，感器周围的淋巴液中分布着大量可溶性的蛋白，可结合并运输化学信息物质，帮助化学信号分子到达受体神经元的树突膜上，主要包括气味结合蛋白（odorant binding proteins，OBPs）和化学感受蛋白（chemosensory proteins，CSPs）2 个蛋白家族。

CSPs 是一类小分子水溶性蛋白，多肽链一般由 110～120 个氨基酸组成，氨基酸序列中有 4 个保守的半胱氨酸位点，分子内相邻的 2 个半胱氨酸残基形成 2 个链内二硫键，在二级结构上有 6 个 α-螺旋，整个分子呈球形，内部具有疏水结合腔，亲水性比 OBPs 较高，昆虫 CSPs 主要功能之一是结合非挥发性的气味化合物到达位于神经元膜上的气味受体，对外界气味分子的识别是实现 CSPs 生理功能的重要步骤（Angeli *et al*., 1999；Lartigue *et al*., 2002；Jansen *et al*., 2007）。McKenna 等（1994）首次利用差减 cDNA 分析方法在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的触角中检测到一种可溶性蛋白 OS-D，随后研究者相继在鳞翅目（Maleszka and Stange，1997；Picimbon *et al*., 2000a；Jacquin-Joly *et al*., 2001）、膜翅目（Briand *et al*., 2002；Ishida *et al*., 2002）、直翅目（Angeli *et al*., 1999；Picimbon *et al*., 2000b；Ban *et al*., 2003a；Zhou *et al*., 2012）和竹节虫目（Mameli *et al*., 1996；Tuccini *et al*., 1996；Marchese *et al*., 2000）等几乎所有昆虫类群中发现该类蛋白。由于其大多在感受器的淋巴液中表达，并且具有配基结合特性，推测它们主要参与昆虫的化学感受过程，因此将这一类蛋白命名为化学感受蛋白。

CSPs 在昆虫中的保守性强，不同目、科昆虫之间具有较高的同源性。Xu 等（2009）对 8 个目 100 多种 CSPs 的氨基酸序列分析表明，许多来自不同目昆虫 CSPs 的序列处在同一个进化分支，表明这些 CSPs 在进化中较为保守。而昆虫 CSPs 的种内差异性通常大于种间，如 CSP1 在东亚蝗和沙漠蝗中的序列一致性约为 90%，而东亚蝗中 CSP1 和 CSP2 的序列一致性仅为 55%（Ban *et al*., 2003a；Maleszka *et al*., 2007），由此表明这些基因的分化早于物种形成。而种内 CSPs 氨基酸序列的多样性表明化学感受蛋白家族功能的多样性。

近年来，大量研究表明 CSPs 的表达具有广泛性，不仅在昆虫的感觉器官，如触角、喙、跗节、下唇须中大量表达（Picimbon *et al*., 2001；Jin *et al*., 2006），而且在昆虫的非化学感受器官，如信息素分泌腺体、生殖器官中也有表达，推测它可能参与信息化学物质的运输与释放（Jacquin-Joly *et al*., 2001；Dani *et al*., 2011；Gu *et al*., 2013）。此外，研究表明 CSPs 还参与除化学识别之外的其他功能。在美洲蟑螂中发现的 CSP（p10），表达于触角和足，并可参与足的再生（Nomura *et al*., 1992；Kitabayashi *et al*., 1998）。在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中，发现 CSP5 特异性存在于卵中并参与胚胎发育（Maleszka *et al*., 2007）。在东亚飞蝗中，存在于脑部的 CSP3 在群居型和散居型的生理形态转换中发挥关键作用（Guo *et al*., 2011）。在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和烟青虫 *Heliothis assulta* 口器中，大量表达的 CSP4 在吸食过程中作为表面活性剂发挥作用（Liu YL *et al*., 2014）。在烟粉虱和家蚕中，发现 CSPs 可以作为杀虫剂的清除剂，从而在昆虫抗药性中发挥作用（Liu GX *et al*., 2014；Xuan *et al*., 2014）。然而，CSPs 在化学感受中的作用目前还缺少体内的直接证据。CSPs 在外部感受器官和内部非感受器官的广泛分布暗示该类蛋白可能具有多重功能。

家蚕 *Bombyx mori* 是我国传统的特色经济昆虫，也是研究鳞翅目昆虫模式生物，在研究昆虫变态发育及农林业害虫防治中也发挥着重要作用。研究家蚕化学信息的感受机制，对指导蚕业生产和鳞翅目害虫的防治具有重要意义。蛋白序列比对分析发现家蚕 CSP16 和西方蜜蜂中 CSP5 在同一个进化分支，西方蜜蜂 CSP5 基因主要在卵中表达，RNAi 实验表明 CSP5 在胚胎发育过程中发挥重要作用（Maleszka *et al*., 2007）。目前有关家蚕 CSP16 的生理功能还没有报道，CSP16 是否也参与家蚕卵期的发育尚不清楚。本研究以家蚕 CSP16 为研究对象，利用荧光实时定量 PCR 的方法在分子水平分析该基因在家蚕卵、幼虫、蛹和 5 龄幼虫不同组织的表达特征及蜕皮激素（20-hydroxyecdysone，20E）处理后对不同龄期幼虫中 *csp*16 表达量的影响；同时对该蛋白进行原核表达和纯化，纯化后的 CSP16 用于荧光结合实验，检测该蛋白与不同配体化合物的结合特性，为初步阐明 CSP16 在家蚕中的功能提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫及取样

本实验所用的家蚕品系为大造 P50，由西南大学惠赠。卵保存在 4℃，滞育卵经浸酸催青处理，孵化后幼虫在 25℃，相对湿度为 60%，自然光照条件下，以新鲜桑叶饲养。蜕皮激素（20E）（购自索莱宝）处理包括 1－4 龄盛食期幼虫和 5 龄第 2 天各龄幼虫，采用体表涂抹并喂食涂有 5 g/L 溶于无水乙醇蜕皮激素的桑叶，无水乙醇处理后的同龄幼虫作为对照，处理 24 h 后用于取样。

分别取第 1－9 天非滞育卵，1－5 龄各龄期眠蚕、起蚕和取食 12 h 的蚕体（解剖去除肠道内食物残渣并用 DEPC 水冲洗），以及蛹期分雌、雄每天以整蚕取样；冰上解剖 5 龄第 3 天幼虫，分别取头部、表皮、中肠、脂肪体、马氏管、淋巴液、丝腺、精巢和卵巢。每个样品每组至少取 50 mg 或 10 头蚕，平行取 3 组，所有样品迅速置于无 RNA 酶的离心管中，液氮速冻后保存于－80℃冰箱保存备用。

1.2　总 RNA 的提取

利用 Trizol 试剂（Invitrogen）提取家蚕胚胎、幼虫、蛹的不同发育时期和 5 龄幼虫不同组织的总 RNA，按照大连宝生物的 PrimeScript II 反转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA。

1.3　荧光实时定量 RT-PCR（RT-qPCR）

2 μg 的组织总 RNA 通过反转录试剂盒（TaKaRa）反转录为第一链 cDNA，稀释后用于 RT-qPCR。RT-qPCR 在 Bio-Rad CFX-96 荧光实时定量 PCR 仪上进行。反应体系为 10 μL，含 5 μL FastStart Universal SYBR Green Master（Roche），1 μL稀释后的模板 cDNA，0.3 μL 10 μmol/L 上下游引物。反应条件：95℃预变性 5 min；95℃变性 15 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，共 40 次循环；72℃终延伸 10 min，溶解曲线在 65～95℃之间，每个样品 3 重复。扩增后用 Bio-Rad CFX Manager 2.0 软件对基因的表达量进行分析，每个基因的表达量用家蚕内参基因 *actinA3* 进行均一化，然后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量高低（Ct 为循环阈值，表示每个反应中荧光信号到达设定阈值的循环数），ΔCt = 目的基因平均 Ct 值－内参基因平均 Ct 值，$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{样品1} - \Delta Ct_{样品2}$。RT-qPCR 检测的内参基因为家蚕肌动蛋白基因 *actinA3*（GenBank 登录号：U49854），*csp16* 基因（GenBank 登录号：NM_001098312），*csp16* 和 *actinA3* 的引物序列如下，引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

csp16-forward：5′-CAACAGAATCGGCCCCAGGT-3′；

csp16-reverse：5′-TTAGCCGGCATATTGGCGGA-3′。

actinA3-forward：5′-ATGTGCGACGAAGAAGTTGCC-3′；

actinA3-reverse：5′-AGTGAGCAGGACGGGGTGTT-3′。

1.4　家蚕 CSP16 的原核表达和纯化

将构建的重组表达载体 *csp16*/pET-30b 转化 BL21（DE3）感受态细胞，挑单克隆于 5 mL 含卡那霉素的 LB 培养基过夜培养，次日以 1∶100 的比例（v/v）加入新培养基中 37℃培养，当 OD_{600} 值为约 0.8时按 1∶1 000 的比例（v/v）加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG，37℃诱导 3 h，SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达。诱导后表达有目的蛋白的菌液通过离心收集菌体，用 15 mL 50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4 的缓冲液悬浮，超声破碎并离心，SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白表达形式。结果表明 CSP16 以可溶性的形式存在于上清中。按照已报道的方法，可溶性表达的 CSP 可直接将超声后上清用离子交换树脂 CM-52 和 Superose-12（Whatman）及凝胶过滤层析纯化（Ban *et al*., 2003b；Qiao *et al*., 2011）。

1.5　荧光结合实验

以 1-NPN（N-phenyl-1-naphthylamine）（Sigma）为荧光探针，在室温用 SpectraMax M5/M5e 多功能酶标仪测定探针与 CSP16 的亲和力。在终浓度为 2 μmol/L 的 CSP16 蛋白中依次加入 1 mmol/L 溶于甲醇的 1-NPN 至终浓度分别为 2～16 μmol/L，使蛋白上结合的探针达到饱和。用 337 nm 的激发光激发，记录 380～450 nm 范围内的荧光发射光谱及最大强度值。

其他配体化合物与 CSP16 的亲和力通过化合物与探针的竞争性结合来检测，在终浓度分别为 2 μmol/L的 CSP16 和 1-NPN 的混合物中，依次加入 1 mmol/L 溶于甲醇中的不同配体至终浓度分别为 2～16 μmol/L，同上记录 380～450 nm 范围的最大荧光强度值。每样品重复测定 3 次，数据取平均值。

以在理想状态下蛋白活性为 100%，饱和状态时蛋白和配基结合比例为 1∶1，通过荧光强度的变化计算结合外源配体分子的浓度。根据 IC_{50} 值计算竞争外源气味分子配基的解离浓度，公式：$K_d = [IC_{50}]/(1+[1\text{-NPN}])/K_{1\text{-NPN}})$，其中 IC_{50} 是外源配体分子替换 50% 1-NPN 时浓度，[1-NPN] 为未结合 1-NPN 浓度，$K_{1\text{-NPN}}$ 为 CSP16/1-NPN 复合物的解离常数（Qiao *et al*., 2011）。

1.6　数据分析

组织表达量数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法(Livak and Schmittgen, 2011)来分析基因的相对表达情况，根据上述方法分别对每个模板的 3 个生物学重复数据进行分析。数据统计检验使用 SPSS 软件进行 ANOVA 单因素方差和独立样本 *T* 检验进行分析，$P<0.05$ 表示有显著性差异。

2　结果与分析

2.1　*csp*16 基因在家蚕不同发育时期和不同组织的表达分析

为研究家蚕 *csp*16 基因在家蚕不同发育时期和不同组织中的表达情况，利用 RT-qPCR 的方法，分别设计 *csp*16 和内参基因 *actinA*3 的特异引物，合成家蚕胚胎、幼虫、蛹和 5 龄幼虫不同组织的 cDNA，并用于 RT-qPCR 分析。扩增数据用 Bio-Rad CFX Manager 2.0 软件和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的计算方法进行分析。所有样品用内参基因进行均一化。

结果表明，*csp*16 基因在家蚕的不同发育时间都有表达，但其表达水平存在明显差异。在不同发育时期的胚胎中，第 1 天表达量最高，随着发育时间的延长，表达量依次降低，直到第 6 天的表达量稍有上升，孵化前再次下降(图 1)。

为检测 *csp*16 基因在不同龄期幼虫觅食、蜕皮和眠过程中的表达特征，分别选取 1－5 龄期幼虫的眠蚕、起蚕和取食 12 h 的样品进行 RT-qPCR 分析。结果表明，*csp*16 基因在幼虫不同时期的表达特征具有规律性，其在每个龄期幼虫眠蚕中表达量明显上升，起蚕和取食 12 h 的幼虫中表达量极少或无表达(图 2)。

在蛹期的雌、雄样品中，*csp*16 在化蛹后的第1－8 天都有表达，但初期表达量较低，蛹后期的表达量急剧增加，其中化蛹第 5 天雌、雄蛹的表达量最高，第 6－8 天的表达量先升高后降低(图 3)。

5 龄第 3 天幼虫不同组织中基因的表达分析结果显示，*csp*16 在除血淋巴外的其他组织中都有不同程度的表达，其中表皮中表达量最高，头部、精巢、卵巢、中肠和脂肪体中也有表达，马氏管和丝腺中表达量较少(图 4)。

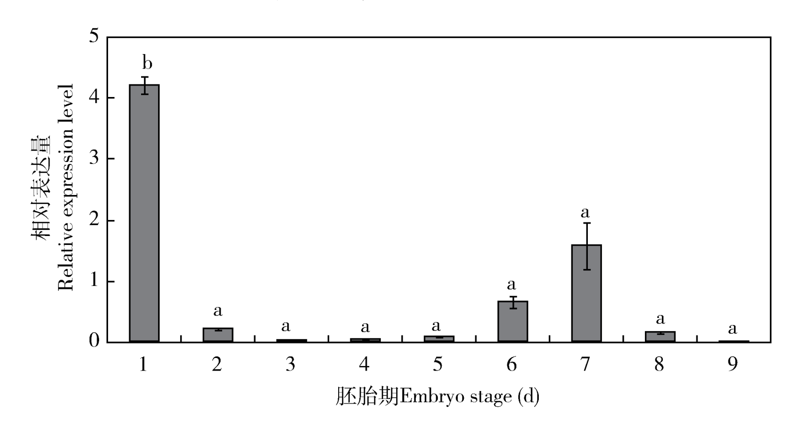


图 1　实时荧光定量 PCR 分析 *csp*16 基因在家蚕胚胎不同发育阶段的表达

Fig. 1　Expression analysis of *csp*16 gene in different developmental stages of *Bombyx mori* embryo by RT-qPCR

图中数据为平均值±标准差；柱上有相同字母的为差异不显著，具不同字母的为差异显著，显著水平 $\alpha=0.05$(ANOVA 单因素方差分析)。图 2～4 同。The data in the figure are mean ± *SD*. The same letters on the columns represent no significant difference, and those labeled with different letters are significantly different at the $\alpha=0.05$ level (ANOVA single factor variance analysis). The same for Figs. 2－4.

2.2　*csp*16 基因在蜕皮激素处理家蚕前后的表达分析

正常家蚕中 *csp*16 基因的表达分析表明，*csp*16 基因大量表达于每个龄期的眠蚕和 5 龄第 3 天幼虫表皮，由此推测该基因可能与幼虫蜕皮过程相关。进一步用蜕皮激素(20E)和对照无水乙醇处理每个龄期盛食期幼虫后 24 h，取不同组织样品进行 RT-qPCR 分析。结果表明，与对照相比，用蜕皮激素处理后 1－4 龄幼虫中 *csp*16 的表达量出现明显上调，其中 4 龄幼虫在蜕皮激素处理后 *csp*16 表达量显著上调；在正常 5 龄幼虫中 *csp*16 表达量较高的组织是头部和表皮，处理后也有不同程度的上调表达(图 5)。

2.3　家蚕 CSP16 的原核表达和纯化

将重组表达载体 *csp*16/pET-30b 转化 BL21 (DE3)感受态细胞，当 OD_{600} 至 0.6～0.8 时，加入 IPTG 诱导 3 h，SDS-PAGE 检测结果显示，与诱导前相比，诱导后样品在相对分子质量约 13 kD 位置上有明显增强表达条带，与预期的目的蛋白分子量相符。为检测目的蛋白的表达形式，将诱导表达的菌液离心收集，用缓冲液重悬后超声破碎，离心后 SDS-PAGE 检测上清和沉淀。结果显示，大部分目的

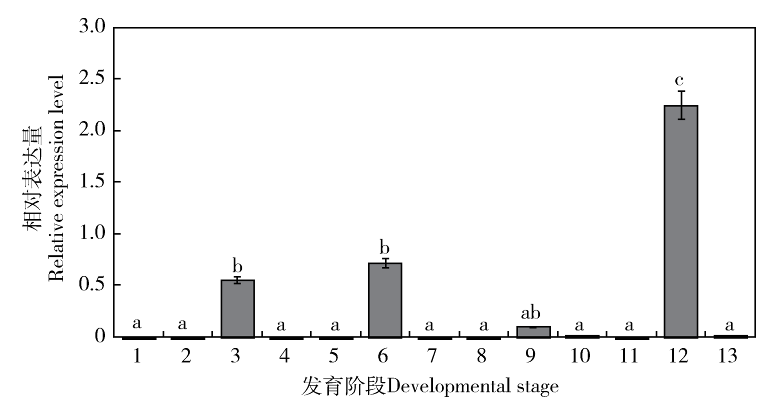


图 2　实时荧光定量 PCR 分析 *csp*16 基因在家蚕 1 – 5 龄幼虫不同时期的表达

Fig. 2　Expression analysis of *csp*16 gene in different developmental stages of the 1st – 5th instar larvae of *Bombyx mori* by RT-qPCR

1：蚁蚕 Newly hatched larva；2：1 龄幼虫取食中 1st instar larva during feeding；3：1 龄眠蚕 1st larval molt；4：2 龄起蚕 Newly molted 2nd instar larva；5：2 龄幼虫取食中 2nd instar larva during feeding；6：2 龄眠蚕 2nd larval molt；7：3 龄起蚕 Newly molted 3rd larva；8：3 龄幼虫取食中 3rd instar larva during feeding；9：3 龄眠蚕 3rd larval molt；10：4 龄起蚕 Newly molted 4th larvae；11：4 龄幼虫取食中 4th instar larva during feeding；12：4 龄眠蚕 4th larval molt；13：5 龄起蚕 Newly molted 5th instar larva.

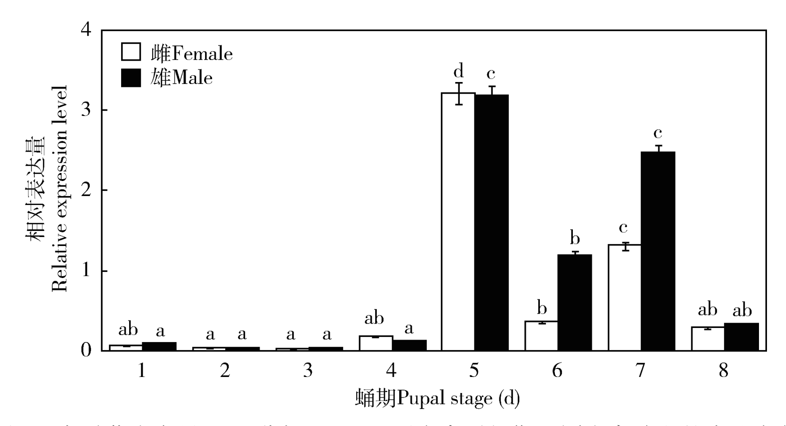


图 3　实时荧光定量 PCR 分析 *csp*16 基因在家蚕蛹期不同发育阶段的表达变化

Fig. 3　Expression analysis of *csp*16 gene in different developmental stages of *Bombyx mori* pupae by RT-qPCR

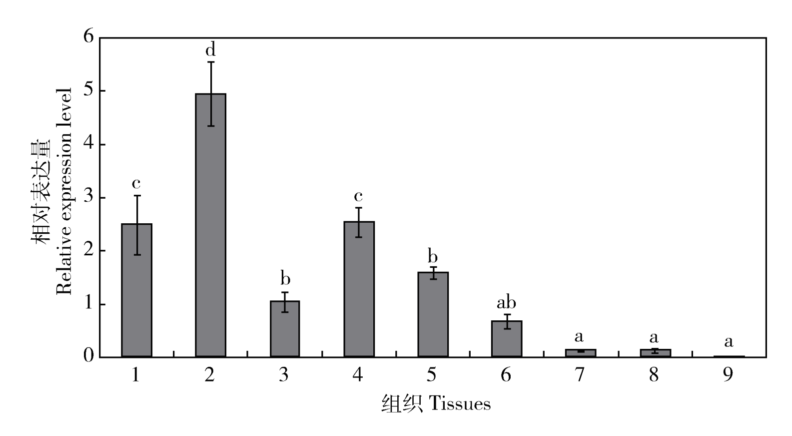


图 4　实时荧光定量 PCR 分析 *csp*16 基因在家蚕 5 龄幼虫不同组织的表达

Fig. 4　Expression analysis of *csp*16 gene in different tissues of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* by RT-qPCR

1：头 Head；2：表皮 Epidermis；3：精巢 Testis；4：卵巢 Ovary；5：中肠 Midgut；6：脂肪体 Fat body；7：马氏管 Malpighian tubules；8：丝腺 Silk gland；9：血淋巴 Hemolymph.

蛋白以可溶性形式存在于上清。进一步通过阳离子交换柱（CM-52）和凝胶过滤层析（Superose-12）对上清中的可溶性目的蛋白进行分步纯化，结果显示目的蛋白分子量正确且条带单一，纯化效果较好（图 6）。

2.4　家蚕 CSP16 的荧光结合实验

纯化后的 CSP16 被用于荧光结合竞争实验，检测 CSP16 与不同配体化合物的结合特性。CSP16 蛋白与探针 1-NPN 的结合曲线表明，二者结合效果较好，其解离常数为 1.8 μmol/L。通过竞争性结合实

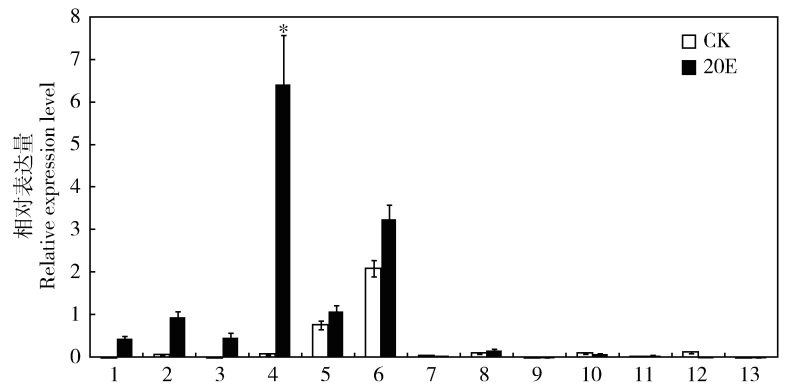


图 5 实时荧光定量 PCR 分析 *csp*16 基因在蜕皮激素(20E)处理家蚕前后幼虫中的表达

Fig. 5 Expression analysis of *csp*16 gene in *Bombyx mori* larvae before and after treatment with 20-hydroxyecdysone (20E) by RT-qPCR

1: 1 龄幼虫取食中 1st instar larva during feeding; 2: 2 龄幼虫取食中 2nd instar larva during feeding; 3: 3 龄幼虫取食中 3rd instar larva during feeding; 4: 4 龄幼虫取食中 4th instar larva during feeding; 5: 头 Head; 6: 表皮 Epidermis; 7: 精巢 Testis; 8: 卵巢 Ovary; 9: 中肠 Midgut; 10: 脂肪体 Fat body; 11: 马氏管 Malpighian tubule; 12: 丝腺 Silk gland; 13: 血淋巴 Hemolymph. 星号表示处理与对照(无水乙醇)间差异显著($P<0.05$, T 检验)。The asterisk indicates significant difference between the treatment and the control (alcohol) ($P<0.05$, T test).

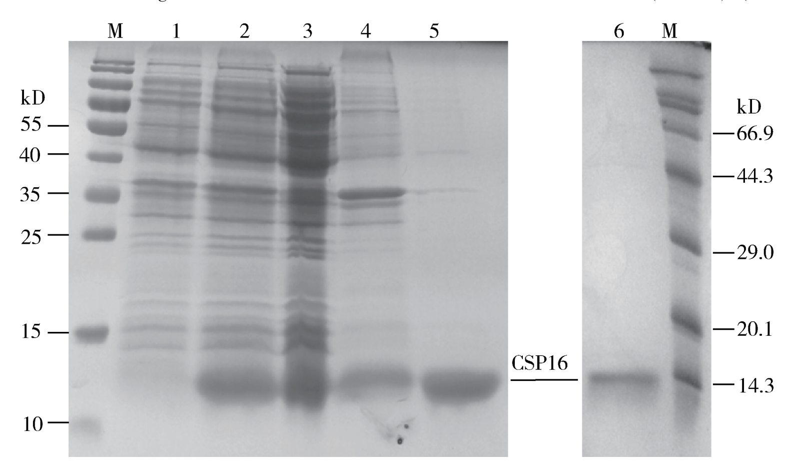


图 6 家蚕 CSP16 表达和纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of expressed and purified *Bombyx mori* CSP16

M: 蛋白分子量标准(Protein molecular weight marker); 1: 诱导前的 *csp*16/pET-30b (Non-induced *csp*16/pET-30b); 2: 诱导后的 *csp*16/pET-30b (Induced *csp*16/pET-30b); 3: 超声破碎后离心上清液(Supernatant after sonication); 4: 超声破碎后离心沉淀(Pellet after sonication); 5: CM-52 纯化后的 CSP16 蛋白(Purified CSP16 by CM-52); 6: Superose-12 纯化后的 CSP16 (Purified CSP16 by Superose-12).

验检测 CSP16 与 65 种不同结构和分子量的外源配体化合物(醇类、酯类、醛类、酚类和苯环类等)的亲和力,结果表明,只有其中 6 种化合物结合效果相对较好,但其置换探针的比例都低于 50%,无法计算出其 K_d 值,初步说明这些化合物和家蚕 CSP16 蛋白亲和力较弱(图 7)。

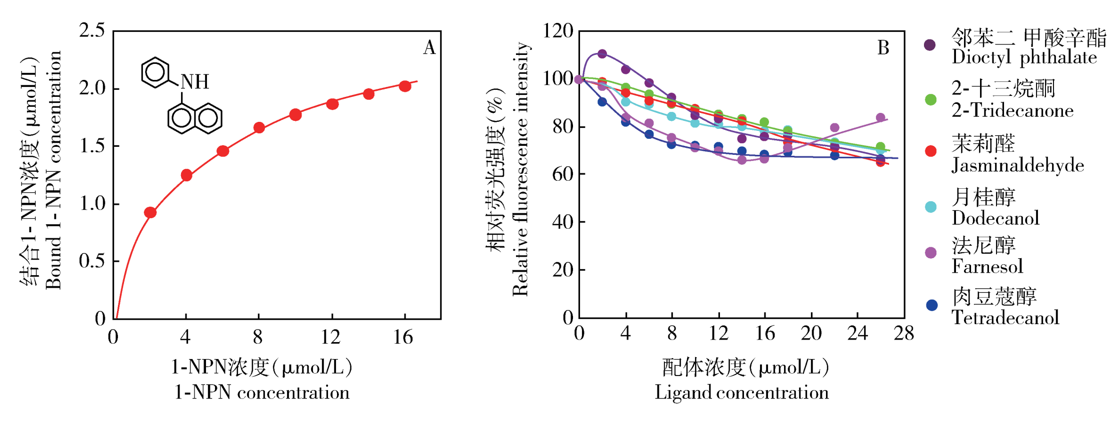


图 7 1-NPN 与家蚕 CSP16 的结合及结合 1-NPN 的 CSP16 与配体分子的竞争结合

Fig. 7 Binding of 1-NPN to *Bombyx mori* CSP16 and competitive binding of CSP16 with ligands

A: 1-NPN 与 CSP16 蛋白的结合曲线 Binding curve of 1-NPN to CSP16; B: 外源配体分子与 CSP16 的竞争性结合曲线 Competitive binding curve of 1-NPN in CSP16 with external ligands.

3 讨论

不同昆虫物种的 CSPs 序列的进化树分析显示家蚕 CSP16 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* CSP5 在同一分支上，西方蜜蜂卵中特异表达的 CSP5 是胚胎正常发育必需的（Maleszka *et al*., 2007）。为研究家蚕中 CSP16 的功能，首先在 mRNA 水平利用 RT-qPCR 对 *csp*16 在家蚕胚胎、幼虫、蛹期的不同发育阶段和 5 龄幼虫不同组织的表达情况进行研究。结果显示，家蚕 *csp*16 在产卵后第 1 天表达量最高，随着发育时间的延长，表达水平逐渐下降，第 7 天出现一个小的表达高峰，随后再次下降，由此推测 CSP16 可能与西方蜜蜂 CSP5 类似，在家蚕胚胎发育过程中发挥重要作用。在 1 – 5 龄家蚕幼虫不同发育时期，*csp*16 呈现出规律性表达，在各龄期眠蚕中表达量最高，起蚕和取食幼虫中几乎无表达；5 龄第 3 天幼虫不同组织中，*csp*16 在表皮、头部等化学感受器官中表达量较高，精巢、卵巢等非化学感受器官中也有表达，内部组织除中肠和脂肪体中有表达外，其他组织中表达量极少，该结果与 CSP 广泛分布于昆虫化学和非化学感受器相一致（Qiao *et al*., 2013）。通过蜕皮激素（20E）处理家蚕不同龄期幼虫后发现，*csp*16 在 1 – 4 龄幼虫和 5 龄幼虫头部和表皮中的表达量上调，其中在 4 龄幼虫中显著上调。已有研究表明，西方蜜蜂羽化蜕皮时，*csp*3 和 *csp*6 表达量显著上调（Maleszka *et al*., 2007）。云杉色卷蛾 *csp* 的表达量受蜕皮影响而显著上调（Wanner *et al*., 2005）。由此推测，*csp*16 在幼虫眠蚕中的特异性表达及蜕皮激素刺激后的上调表达表明其可能与家蚕的蜕皮过程相关。在蛹期，*csp*16 在蛹初期表达量较低，后期表达量较高，其中第 5 天雌、雄蛹中表达量最高。在家蚕蛹期正常发育过程中，蜕皮激素在化蛹后第 2 – 3 天的滴度最高（苏保锦等，2012），而 *csp*16 在化蛹后第 5 天达到表达高峰，因此 *csp*16 是否参与蜕皮激素调控的蛹期发育和组织分化过程还有待进一步研究。

此外，本研究在前期工作基础上，对家蚕 CSP16 的进行原核诱导表达，结果表明，该蛋白以可溶性形式大量表达，通过离子交换和凝胶过滤层析分步纯化，获得了纯度较高的 CSP16 蛋白。纯化后的 CSP16 用于体外荧光结合实验来确定其与不同配体化合物的亲和力。CSP16 蛋白与荧光探针 1-NPN 具有很好的结合特性，表明纯化后的 CSP16 具有较高的活性，而与不同结构和分子量的配体化合物亲和力都较弱，其置换探针的比例都低于 50%。已有研究表明，家蚕 CSP1 可结合视黄醛、4-羟基-4-二甲基偶氮苯基等化合物结合，CSP2 与视黄醛、3，7-二甲基辛基苯甲酸及一些线性醇类、醛类芳香族化合物具有较高的亲和力（Qiao *et al*., 2013），CSP4 与芳香醛类、芳香酮类化合物结合较好（邓培渊等，2011），表明了家蚕中部分 CSPs 具有携带小分子化合物的特性，但家蚕 CSP16 与这些化合物的结合都很弱。除家蚕外，多种昆虫 CSPs 和醇类、醛类或酯类有较高的亲和力。如棉铃虫的化学感受蛋白 HarmCSP5 可以和许多醛类化合物如 4-乙基苯甲醛、3，4-二氟苯甲醛等高效结合（Zhang *et al*., 2013）；中华蜜蜂 *Apis cerana* 化学感受蛋白 AcerCSP3 与水杨酸甲酯、β-紫罗兰酮、3，4-二甲基苯甲醛及苯乙醛有较强的结合能力（Li *et al*., 2016）。由此推测，家蚕 CSP16 可能具有除化学识别之外的其他功能。

综上所述，*csp*16 在家蚕胚胎、幼虫、蛹和 5 龄幼虫的大部分组织都有表达，但表达特点各不相同。结合特性分析表明，家蚕 CSP16 与醇类、酯类、醛类、酚类和苯环类等化合物的亲和力都较弱。已有研究表明，CSP 在家蚕不同时期表达量的差异可能暗示了它们在该发育阶段的不同功能（Gong *et al*., 2007；Qiao *et al*., 2013）。家蚕 *csp*16 在不同龄期幼虫中规律性表达及蜕皮激素处理后上调表达，提示 CSP16 可能参与家蚕的蜕皮过程。然而，需要进一步通过基因敲除和过表达等手段进行深入研究，进而阐明不同 CSPs 的生理功能。该研究结果不仅为家蚕 CSPs 功能的进一步深入研究奠定了基础，同时为家蚕 CSPs 新功能的研究提供了借鉴。

参考文献（References）

Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur. J. Biochem*., 262(3): 745 – 754.

Ban LP, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003a. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Mol. Biol*., 12(2): 125 – 134.

Ban LP, Scaloni A, D'Ambrosio C, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003b. Biochemical characterization and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusta migratoria*. *Cell. Mol. Life Sci*., 60(2): 390 – 400.

Briand L, Nespoulous C, Huet JC, Takahashi M, Pernollet JC, 2002.

Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *Eur. J. Biochem.*, 269(18): 4586-4596.

Dani FR, Michelucci E, Francese S, Mastrobuoni G, Cappellozza S, La Marca G, Niccolini A, Fellicioli A, Moneti G, Pelosi P, 2011. Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkmoth *Bombyx mori*. *Chem. Senses*, 36 (4): 335-344.

Deng PY, Qiao HL, Li DD, Lu YF, Li SC, Kan YC, 2011. Expression pattern and binding specificity of chemosensory protein BmCSP4 in the silkworm, *Bombxy mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 54 (8): 869-876. [邓培渊, 乔惠丽, 李丹丹, 鲁云风, 李生才, 阚云超, 2011. 家蚕化学感受蛋白 BmCSP4 表达谱及结合特性分析. 昆虫学报, 54(8): 869-876]

Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Lin Y, Xia QY, Xiang ZH, 2007. Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(3): 266-277.

Gu SH, Wu KM, Guo YY, Pickett JA, Field LM, Zhou JJ, Zhang YJ, 2013. Identification of genes expressed in the sex pheromone gland of the black cutworm *Agrotis ipsilon* with putative roles in sex pheromone biosynthesis and transport. *BMC Genomics*, 14: 636.

Guo W, Wang X, Ma Z, Xue L, Han J, Yu D, Kang L, 2011. *CSP* and *takeout* genes modulate the switch between attraction and repulsion during behavioral phase change in the migratory locust. *PLoS Genet.*, 7(2): e1001291.

Ishida Y, Chiang V, Leal WS, 2002. Protein that makes sense in the Argentine ant. *Naturwissenschaften*, 89(11): 505-507.

Jacquin-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Nagnan-Le MP, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses*, 26(7): 833-844.

Jansen S, Chmelík J, Zídek L, Padrta P, Novák P, Zdráhal Z, Picimbon JF, Löfstedt C, Sklenár V, 2007. Structure of *Bombyx mori* chemosensory protein 1 in solution. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 66(3): 135-145.

Jin X, Zhang SG, Zhang L, 2006. Expression of odorant-binding and chemosensory proteins and spatial map of chemosensilla on labial palps of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Arthropod Struct. Dev.*, 35(1): 47-56.

Kitabayashi AN, Arai T, Kubo T, Natori S, 1998. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(10): 785-790.

Lartigue A, Campanacci V, Roussel A, Larsson AM, Jones TA, Tegoni M, Cambillau C, 2002. X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *J. Biol. Chem.*, 277(35): 32094-32098.

Li HL, Ni CX, Tan J, Zhang LY, Hu FL, 2016. Chemosensory proteins of the eastern honeybee, *Apis cerana*: identification, tissue distribution and olfactory related functional characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 194-195: 11-19.

Liu GX, Xuan N, Chu D, Xie HY, Fan ZX, Bi YP, Picimbon JF, Qin YC, Zhong ST, Li YF, Gao ZL, Pan WL, Wang GY, Rajashekar B, 2014. Biotype expression and insecticide response of *Bemisia tabaci* chemosensory protein-1. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 85 (3): 137-151.

Liu YL, Guo H, Huang LQ, Pelosi P, Wang CZ, 2014. Unique function of a chemosensory protein in the proboscis of two *Helicoverpa* species. *J. Exp. Biol.*, 217(pt10): 1821-1826.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25, 402-408.

Maleszka J, Foret S, Saint R, Maleszka R, 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Genes Evol.*, 217(3): 189-196.

Maleszka R, Stange G, 1997. Molecular cloning by a novel approach, of a cDNA encoding a putative olfactory protein in the labial palps of the moth *Cactoblastis cactorum*. *Gene*, 202(1-2): 39-43.

Mameli M, Tuccini A, Mazza M, Petacchi R, Pelosi P, 1996. Soluble proteins in chemosensory organs of phasmids. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(8-9): 875-882.

Marchese S, Angeli S, Andolfo A, Scaloni A, Brandazza A, Mazza M, Picimbon JF, Leal WS, Pelosi P, 2000. Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(11): 1091-1098.

McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J. Biol. Chem.*, 269(23): 16340-16347.

Nomura A, Kawasaki K, Kubo T, Natori S, 1992. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Int. J. Dev. Biol.*, 36(3): 391-398.

Picimbon JF, Dietrich K, Angeli S, Scaloni A, Krieger J, Breer H, Pelosi P, 2000a. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 44(3): 120-129.

Picimbon JF, Dietrich K, Breer H, Krieger J, 2000b. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(3): 233-241.

Picimbon JF, Dietrich K, Krieger J, Beer H, 2001. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(12): 1173-1181.

Qiao HL, Deng PY, Li DD, Chen M, Jiao ZJ, Liu ZC, Zhang YZ, Kan YC, 2013. Expression analysis and binding experiments of chemosensory proteins indicate multiple roles in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 59(7): 667-675.

Qiao HL, He XL, Schymura D, Ban LP, Field L, Dani FR, Michelucci E, Caputo B, Della Torre A, Iatrou K, Zhou JJ, Krieger J, Pelosi P, 2011. Cooperative interactions between odorant-binding proteins of *Anopheles gambiae*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68(10): 1799-1813.

Su BJ, Wu Y, Zhao SS, Zhao GD, Wei ZG, Li B, Shen WD, 2012. Ecdysone induction leads to changes in expression of ecdysone

receptor and ultraspiracle genes in *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 38(2): 257-263. [苏保锦，吴玉，赵斯斯，赵国栋，卫正国，李兵，沈卫德，2012. 蜕皮激素诱导家蚕蜕皮激素受体和超气门蛋白基因的表达变化. 蚕业科学，38(2): 257-263]

Tuccini A, Maida R, Rovero P, Mazza M, Pelosi P, 1996. Putative odorant-binding proteins in antennae and legs of *Carausius morosus* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(1): 19-24.

Wanner KW, Isman MB, Feng Q, Plettner E, Theilmann DA, 2005. Developmental expression patterns of four chemosensory protein genes from the Eastern spruce budworm, *Chroistoneura fumiferana*. *Insect Mol. Biol.*, 14(3): 289-300.

Xu YL, He P, Zhang L, Fang SQ, Dong SL, Zhang YJ, Li F, 2009. Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics*, 10: 632.

Xuan N, Guo X, Xie HY, Lou QN, Lu XB, Liu GX, Picimbon JF, 2014. Increased expression of CSP and CYP genes in adult silkworm females exposed to avermectins. *Insect Sci.*, 22(2): 203-219.

Zhang TT, Wang WX, Zhang ZD, Zhang YJ, Guo YY, 2013. Functional characteristics of a novel chemosensory protein in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). *J. Integr. Agric.*, 12(5): 853-861.

Zhou XH, Ban LP, Iovinella I, Zhao LJ, Gao Q, Felicioli A, Sagona S, Pieraccini G, Pelosi P, Zhang L, Dani FR, 2012. Diversity, abundance and sex-specific expression of chemosensory proteins in the reproductive organs of the locust *Locusta migratoria manilensis*. *Biol. Chem.*, 394(1): 43-54.

（责任编辑：袁德成）